

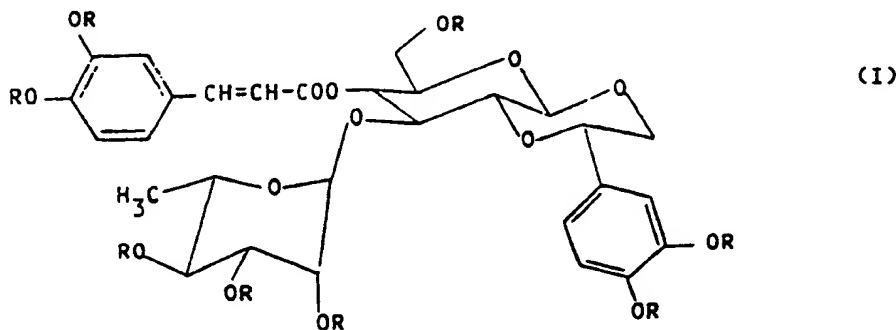


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07H 15/18, A61K 7/48, 31/70	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/16544 (43) Date de publication internationale: 1er octobre 1992 (01.10.92)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00229</p> <p>(22) Date de dépôt international: 21 mars 1991 (21.03.91)</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PARFUMS CHRISTIAN DIOR [FR/FR]; 30, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ANDARY, Claude [FR/FR]; 642, avenue de la Justice, F-34090 Montpellier Cédex (FR). ANDRE, Patrice [FR/FR]; 9, rue Charles, F-45170 Neuville-aux-Bois (FR).</p> <p>(74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>

(54) Title: NOVEL DERIVATIVE OF CAFFEIC ACID, ORAPOSIDE, COSMETIC OR PHARMACEUTICAL, PARTICULARLY DERMATOLOGICAL, COMPOSITION CONTAINING IT

(54) Titre: NOUVEAU DERIVE DE L'ACIDE CAFEIQUE, L'ORAPOSIDE, COMPOSITION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE, NOTAMMENT DERMATOLOGIQUE LE CONTENANT



(57) Abstract

A novel derivative of caffeic acid has formula (I) where one or several R independently represent a hydrogen atom, a C₁-C₅ alkyl group, particularly methyl, an acyl group, particularly C₁-C₆, specifically acetyl. This novel derivative designated oraposide is particularly useful for preparing cosmetic or pharmaceutical, particularly dermatological, compositions due particularly to its activity against free radicals, inflammation and actinic ageing.

(57) Abrégé

L'invention concerne un nouveau dérivé de l'acide caféique. Ce nouveau dérivé présente la formule (I) dans laquelle un ou plusieurs R représentent indépendamment un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C₁-C₅, en particulier méthyle, un groupe acyle, en particulier en C₁-C₆, notamment acétyle. Ce nouveau dérivé dénommé oraposide est particulièrement utile pour la préparation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques, grâce en particulier à une activité antiradicaux libres, anti-inflammatoires et anti-vieillesse actinique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse	KR	République de Corée	SE	Suède
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

Nouveau dérivé de l'acide caféique, l'oraposide, composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique le contenant.

05 La présente invention concerne essentiellement un nouveau dérivé de l'acide caféique, l'oraposide, une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique le contenant.

Plus particulièrement, le nouveau dérivé de l'invention, l'oraposide, est un dérivé de l'acide caféique extrait de végétaux de la famille des Orobanchaceae. L'invention couvre également des dérivés particuliers de l'oraposide, notamment des dérivés acylés, ainsi que les extraits de plante en contenant, notamment les extraits d'Orobanche rapum genistae.

Des études préliminaires avaient déjà révélé la présence de dérivés de l'acide caféique dans les extraits d'Orobanchacées, plantes phanérogames parasites sans chlorophylle (Andary et al. 1980, II Farmaco, 1, 1-30 ; Bridel et Charaux, 1924, C.R. Acad. Sci. 178, 1839) mais leur structure n'était pas clairement établie.

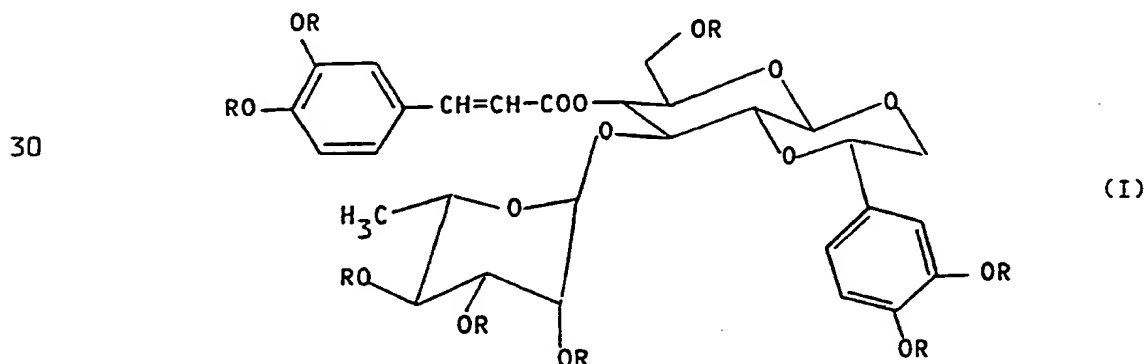
L'intérêt pharmacologique de l'acide caféique (ou acide 3,4-dihydroxycinnamique) et de plusieurs dérivés naturels de celui-ci a déjà fait l'objet de nombreuses études. Ainsi Kimura et al. (Planta Medica, 1984, 473-477) ont étudié l'effet de divers tanins et en particulier de dérivés de l'acide caféique et caféoylquinique extraits de plantes de l'espèce Artemisia et ont montré leur effet inhibiteur sur la peroxydation des lipides dans les mitochondries et les microsomes de foie de rat. L'action inhibitrice de ces molécules sur les lipoxgénases participant au métabolisme des leucotriènes et de l'acide arachidonique et leur utilisation potentielle dans le traitement d'affections inflammatoires comme l'asthme ont aussi été publiées par Kimura et Okuda (J. of natural products, 1987, 50, 392-399).

L'activité de différents dérivés caféiques étant multiple et variable en fonction de leur structure, il est intéressant de rechercher de nouvelles molécules de cette famille, dans les plantes médicinales ou autres, et d'en chercher de nouvelles activités pharmacologiques ou des performances supérieures.

Ainsi, il a été obtenu, à partir d'extraits de plantes de la famille des Orobanchaceae qui parasitent divers genêts (*Cytisus scoparius* et *purgans*) ainsi que des plantes alimentaires comme les lentilles, les fèves, les solanées (tomates, aubergines...), un nouveau composé présentant des propriétés particulièrement intéressantes. L'Orobanche est une plante vivace représentée par une tige fleurie en épi, la plante entière peut atteindre une longueur de 20 à 100 cm avec des écailles le long de la tige qui se terminent à la base par un bulbe recouvert également d'écailles. Toute la plante est riche en dérivés esters hétérosidiques caféiques. Le bulbe, l'organe fixé sur les racines de la plante-hôte par des crampons ayant la forme de petites racines, est l'organe le plus riche en ces esters hétérosidiques caféiques.

La substance extraite de l'Orobanche rapum genistae a été obtenue à l'état pur et cristallisé, par exemple par macération alcoolique d'un extrait de plante ou de cellules de plante et soumise aux diverses analyses classiques permettant d'en établir la configuration moléculaire et la structure (séparations chromatographiques, détermination du point de fusion, études des spectres RMN, de masse, aux rayons X, IR et UV et diverses analyses biochimiques). La formule qui a été déduite de ces analyses est la suivante : 4-caféate de 3-O-(α -L-rhamnopyranosyl)-[2-(3,4-dihydroxyphényl)-1,2-éthylidène]- β -D-glucopyranoside.

Cette substance, que l'on a proposé d'appeler "oraposide", est représentée par la formule (I) ci-après, dans laquelle R est un atome d'hydrogène.



La présente invention concerne également les dérivés de formule I dans laquelle un ou plusieurs R représentent indépendamment un atome d'hydrogène, un alkyle inférieur en C₁-C₅, en particulier méthyle, ou un groupe acyle, en particulier en C₁-C₆, notamment acétyle.

Selon une autre caractéristique préférée, seuls les groupes OR portés par les cycles phényle sont alkylés, notamment méthylés.

De préférence, seuls les groupes OR portés par les cycles glucopyranosyle ou rhamnopyranosyle sont acylés, notamment acétylés.

En particulier, l'oraposide ou ses dérivés sont extraits à partir d'une plante de la famille des Orobanchacées, en particulier *Orobanche rapum genistae*.

On peut obtenir de tels dérivés par des méthodes classiques bien connues de l'homme de l'art.

Notamment pour préparer des dérivés peracétylés de l'oraposide, on peut opérer suivant une méthode simple qui consiste en ce que les cristaux d'oraposide sont dissous dans un volume d'anhydride acétique auquel on ajoute un volume de pyridine. On laisse une nuit entière à la température ambiante. Le lendemain, on filtre, on ressolubilise le dérivé de l'invention et on lyophilise. On obtient ainsi le dérivé peracétylé de l'oraposide, c'est-à-dire que tous les groupes OR portés par les cycles glucopyranosyle ou rhamnopyranosyle sont ici acétylés.

Il a maintenant été découvert, de façon inattendue, que l'oraposide et ses dérivés précités possédaient de nombreux effets chimiques et biochimiques tels que piègeur de radicaux libres, antioxydant - prévenant notamment la peroxydation des lipides -, inhibiteur d'aldose réductase, inhibiteur de 5-lipoxygénase, inhibiteur de dopa-décarboxylase, β -bloquant adrénergique, anti-trémorique, anti-allergique, analgésique, antibactérien et antifongique, et présentent une large bande d'adsorption dans le rayonnement ultraviolet UVA et UVB, ce qui permet de les utiliser avantageusement comme filtre solaire.

Ainsi, l'oraposide, ses dérivés précités, les extraits de plante en contenant sont particulièrement précieux, notamment dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

05 Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne donc également une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre d'ingrédient actif, l'oraposide ou ses dérivés de formule I telle que précédemment définie, dans laquelle un ou plusieurs R
10 représentent indépendamment un atome d'hydrogène, un alkyle inférieur en C_1-C_5 , en particulier méthyle, ou un groupe acyle, en particulier en C_1-C_6 , notamment acétyle, ou un extrait de plante en contenant. De préférence, les dérivés acylés sont tels que seuls les groupes OR portés par les cycles glucopyranosyle ou rhamnopyranosyle sont acylés, notamment acétylés. De préférence
15 encore, les dérivés alkylés sont tels que seuls les groupes OR portés par les cycles phényle sont alkylés, notamment méthylés.

Selon une variante de réalisation avantageuse, l'oraposide ou ses dérivés précités sont incorporés à une partie comprise entre environ 0,001 et environ 10 % en poids, de préférence entre
20 0,1 et 5 % en poids de la composition finale.

Suivant un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est une composition à effet piègeur de radicaux libres, inhibiteur d'aldose réductase, inhibiteur de 5-lipoxygénase, inhibiteur de dopa-décarboxylase, β -bloquant,
25 anti-trémorique, ou filtrant du rayonnement ultraviolet UVA et UVB.

Selon une variante avantageuse, les compositions de l'invention précédemment définies ne contiennent ni conservateur supplémentaire antibactérien ou antifongique, ni agent antioxydant supplémentaire, notamment contre l'oxydation des lipides de la
30 forme cosmétique ou pharmaceutique.

La formulation sera naturellement adaptée en fonction de l'usage voulu. La composition peut ainsi être formulée sous une forme de dosage injectable, pour une administration orale ou pour un traitement externe par voie topique. L'excipient sera donc
35 adapté à cette formulation et sera un excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement efficaces dans la prévention du vieillissement de la peau et dans le traitement des états inflammatoires qui accompagnent souvent l'érythème solaire. En effet, dans certaines conditions métabo-

05 liques ou perturbations d'origine externe comme l'exposition au rayonnement ultraviolet, la réduction de l'oxygène est incomplète et aboutit à la formation de radicaux libres pouvant détériorer les phospholipides des membranes cellulaires. La production de radicaux

10 libres entraîne diverses manifestations physiopathologiques qui participent au vieillissement cellulaire et probablement à la cancérogénèse, au phénomène inflammatoire et au processus d'intoxication hépatique.

Ainsi, les compositions selon l'invention sont destinées en particulier à lutter contre les inflammations, aussi bien en

15 application locale que par voie systémique, notamment les inflammations causées par une exposition excessive au soleil, à lutter contre le vieillissement cellulaire, en particulier contre le vieillissement actinique cutané, et à protéger la peau contre le rayonnement ultraviolet UVA et UVB, à la prévention et au

20 traitement des taches pigmentaires cutanées. Elles sont également efficaces dans le traitement des intoxications hépatiques, quelle que soit leur origine et dans le traitement du diabète, notamment du diabète mellitus, et des troubles du cristallin qui lui sont souvent associés, et comme agent analgésique,

25 antiallergique, psychotrope, anti-parkinsonien et anti-hypertenseur.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, dans le cadre d'un traitement anti-trémorique, en particulier de la maladie de Parkinson, la composition selon l'invention précitée

30 contient en outre une quantité thérapeutiquement efficace de L-DOPA. En effet, l'oraposide et ses dérivés de formule I précités possèdent une activité de potentialisation de la L-DOPA dans son activité anti-trémorique, efficace en particulier dans la maladie de Parkinson. L'oraposide et ses dérivés de formule I précités

35 associé à la L-DOPA diminuent en effet expérimentalement sur

l'animal et sur l'homme les tremblements engendrés par un facteur trémogène. Dans la maladie de Parkinson, on constate une amélioration des mouvements anormaux (de type choréique) et autres troubles secondaires dus au traitement à la L-DOPA.

05 L'invention sera maintenant décrite en détail en référence à plusieurs exemples de réalisation donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc limiter la portée de l'invention. Ces exemples sont donnés également en référence à plusieurs figures, objet des dessins annexés, dans lesquels :

10 - la figure 1 représente la quantité de LDH (lactate déshydrogénase) relarguée par 4.10^6 hépatocytes (culture de 8 jours) dans le milieu de culture, 3 et 7 h après traitement. La référence 1 des deux blocs d'histogramme concerne les résultats obtenus avec les cultures non traitées, servant de témoins, la
15 référence 2 représente les blocs d'histogramme obtenus avec les cultures traitées au nitroxynil à la concentration 10^{-4} M, la référence 3 représente les blocs histogramme obtenus avec les cultures traitées au nitroxynil à la concentration 10^{-4} M et au verbascoside à la concentration 5.10^{-5} M, la référence 4 représente
20 les blocs histogramme obtenus avec les cultures traitées au nitroxynil à la concentration 10^{-4} M et à l'oraposide à la concentration 5.10^{-5} M, et la référence 5 représente les blocs histogramme obtenus avec les cultures traitées au nitroxynil à la concentration 10^{-4} M et à l'arénarioside à la concentration 5.10^{-5} M.
25 Le nitroxynil est un agent hépato-toxique, le verbascoside et l'arénarioside sont d'autres esters hétérosidiques de l'acide caféique connus à l'homme de l'art.

- La figure 2 représente la quantité de LDH (lactate déshydrogénase) relarguée par 4.10^6 hépatocytes (culture de 24 h)
30 dans le milieu de culture 3, 7 et 24 h après traitement. De même qu'à la figure 1, la référence 1 représente les résultats obtenus avec les cultures non traitées, la référence 2 les résultats obtenus avec les cultures traitées par le chloroforme 10^{-4} M, et la référence 3 les résultats obtenus avec les cultures traitées
35 par la combinaison de chloroforme 10^{-4} M et d'oraposide à

5.10^{-5} M. Le chloroforme est également un agent hépato-toxique.

- La figure 3 représente l'inhibition de la lipoperoxy-
dation sur des microsomes hépatiques par différents composés
phénoliques à 5.10^{-5} M dans le milieu réactionnel. La référence 1
05 concerne les blocs histogrammes obtenus avec le lot témoin sans
composé phénolique, la référence 2 représente les résultats obtenus
avec le verbascoside, la référence 3 représente les résultats
obtenus avec l'oraposide, la référence 4 représente les résultats
obtenus avec l'arénarioside, la référence 5 représente les résul-
10 tats obtenus avec l'acide rosmarinique, la référence 6 représente
les résultats obtenus avec l'acide isochlorogénique, la référence
7 représente les résultats obtenus avec l'acide chicorique, la
référence 8 représente les résultats obtenus avec l'acide caféique
et la référence 9 représente les résultats obtenus avec la vitamine
15 E (alpha-tocophérol). Le verbascoside, l'oraposide et l'arénario-
side sont des esters hétérosidiques de l'acide caféique et les
acides cités sont d'autres esters de l'acide caféique.

- la figure 4 représente l'inhibition de la lipoperoxy-
dation par l'oraposide à différentes concentrations sur des micro-
20 somes hépatiques de lapins. La référence 1 représente les résultats
obtenus avec le lot témoin sans oraposide, la référence 2 les
résultats obtenus avec l'oraposide à la concentration de 5.10^{-5} M,
la référence 3 les résultats obtenus avec l'oraposide à une concen-
tration de 10^{-5} M, la référence 4 les résultats obtenus avec l'ora-
25 poside à une concentration de 5.10^{-6} M, la référence 5 les résul-
tats obtenus avec l'oraposide à une concentration de 2.10^{-6} M, et
la référence 6 les résultats obtenus avec l'oraposide à une concen-
tration de 10^{-6} M.

Exemple 1

30 Préparation de l'extrait végétal, purification des cristaux, ana-
lyse et établissement de la formule de l'oraposide.

Le matériau de départ est de la poudre de plante
(Orobanche) dégraissée à l'éther de pétrole. Cette poudre est mise
à macérer dans de l'éthanol à 80 % ou du méthanol à 80 %, à raison

de 10 l pour 400 g de poudre de plante, à 50°C. L'extrait obtenu est concentré et lyophilisé. Cet extrait lyophilisé dit "extrait brut d'orobanche" contient de 3 à 5 % en poids d'oraposide.

05 Cette macération alcoolique, après filtration, est additionnée rapidement de 20 ml d'une solution aqueuse fraîchement préparée de métabisulfite de sodium à 10 %. A la suite d'un repos d'une nuit à 4°C, cet extrait est filtré puis concentré de manière à chasser l'alcool. L'extrait devenu aqueux subit un dégraissage définitif par un mélange : éther éthylique débarrassé des
10 peroxydes - éther de pétrole (3 : 1). Cet extrait dégraissé est épuisé par 20 l d'acétate d'éthyle (redistillé sur chlorure de calcium). Les phases "acétate d'éthyle" sont desséchées par du sulfate de sodium (pur, sec), puis réunies et évaporées à sec sous vide. Le résidu poudreux obtenu, de couleur blanc-crème, dit
15 "extrait purifié d'orobanche" contient environ 30 % en poids d'oraposide. Cet extrait purifié peut être dissous dans de l'eau chaude et la solution mise à cristalliser à la température ambiante puis à +4°C pour procéder à une nouvelle purification.

Ces cristaux sont essorés et remis en solution à chaud
20 dans un mélange éthanol 5 % - eau 95 % puis recristallisés à froid. L'opération est répétée plusieurs fois.

Le composant obtenu à l'état de cristaux purs est soumis à diverses analyses classiques, biochimiques et chimico-physiques. On détermine le pouvoir rotatoire $[\alpha]^{20}_D = -110,3^\circ$ (méthanol). Le
25 point de fusion est de 210°C. Le spectre RMN 1H (6 en ppm) est :
7,46 et 6,18(2H,2xd, J = 16 Hz, liaison R - CH = CH - R trans),
5(1H,d,J = 1 Hz, H - 1 Rha), 4,92(1H,t,J = 9,5 Hz, H - 4 Glc),
4,57(1H,t,J = 2,5,9 Hz, H - 7' Aglycone),
4,55(1H,d,J = 7,8 Hz, H - 1 Glc), 4,05(1H,t,J = 9,5 Hz, H - 3 Glc),
30 3,94-3,71(2H,m,J = 12 Hz, 2H - 6 Glc),
3,57(1H,dd,J = 1,3 Hz, H - 2' Rha), 3,45(1H,m,H - 8' Aglycone),
3,38(1H,dd,J = 7,8,9,5 Hz, H - 2 Glc), 1,05(3H,d,J = 6 Hz, 3H -
1 Rha).

Le spectre UV obtenu avec un appareil de type Kontron Uvikon 860^(R) montre un maximum d'absorption en UVA à 330 nm, et présente en UVB un pic à 290 nm. L'intégration des surfaces des pics UVB permet de comparer l'oraposide au Parsol MCX^(R) où l'on peut observer que l'activité d'absorption UVB de l'oraposide est 0,4 fois celle du Parsol MCX^(R). Si l'on procède également à une intégration de la surface du pic UVA de l'oraposide que l'on compare au Parsol 1789^(R), on observe que l'absorption UVA de l'oraposide est environ 0,2 fois celle du Parsol 1789^(R). L'étude des résultats ci-dessus ainsi que des spectres de masse et de rayons X et IR permettent de démontrer que l'oraposide est un 4-caféate de 3-O-(α -L-rhamnopyranosyl)-[2-(3,4-dihydroxyphényl)-1,2-éthylidène]- β -D-glucopyranoside.

15

Exemple 2

Etude in vitro des propriétés de l'oraposide pour la protection des hépatocytes de lapin en culture.

Le modèle expérimental choisi est l'étude de la libération de lactate déshydrogénase (LDH) par les hépatocytes de lapin en culture primaire, cette libération de LDH représentant un marqueur de dégradation des hépatocytes.

Les hépatocytes sont volontairement intoxiqués au nitroxylin (10^{-4} à 10^{-5} M) ou au chloroforme (de 10^{-3} à 10^{-5} M).

L'effet de l'oraposide est évalué pour une concentration de 0,05 mM finale dans le milieu de culture.

La figure 1 montre que l'oraposide diminue très significativement le relargage de LDH par les hépatocytes intoxiqués au nitroxylin et la figure 2 montre un effet moins net sur les cellules traitées au chloroforme mais celui-ci a un effet moins toxique.

L'oraposide par lui-même ne présente aucune toxicité cellulaire, même à une concentration de 100 μ M.

35

Exemple 3Etude in vitro de l'inhibition de la lipoperoxydation à partir des microsomes hépatiques de lapin.

05 Une réaction de lipoperoxydation se produit lorsqu'on incube des microsomes hépatiques de lapin en présence de NADPH.

Les microsomes sont récupérés après traitement des hépatocytes aux ultrasons.

10 La lipoperoxydation est évaluée par la formation de malonyldialdéhyde selon la méthode de Placer et al., 1966, (Analyt. Biochem. 16, 359-364).

La réaction est effectuée en absence (témoin) et en présence d'acide caféique ou d'oraposide à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M ou en présence d' α -tocophérol (Sigma) à $5 \cdot 10^{-5}$ M (référence d'activité inhibitrice connue).

15 La figure 3 montre clairement que l'acide caféique et l' α -tocophérol ont une activité inhibitrice équivalente et que l'oraposide assure une inhibition plus forte (100 %).

La dose d'oraposide nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 % est de 10^{-5} M (figure 4).

20 De plus, il est possible de potentialiser l'oxydation des lipides membranaires par des générateurs de radicaux libres (CCl_4 et H_2O_2) ; dans ces conditions l'inhibition par l'oraposide est de 100 % avec le CCl_4 et de 90 % avec l' H_2O_2 .

Exemple 4

25 Mise en évidence d'une activité antibactérienne et antifongique.

On sait qu'un certain nombre de dérivés de l'acide caféique inhibent la multiplication des bactéries et champignons. Cette propriété a été confirmée pour l'oraposide sur 40 souches différentes appartenant à 10 genres de bactéries, ainsi que sur 25 souches différentes appartenant à 25 espèces de champignons.

30 On observe 100 % d'inhibition de toutes les souches bactériennes dès la dose de 0,5 mg/ml. Les souches bactériennes testées sont : Staphylococcus aureus ; Streptococcus (groupe A et groupe D) ; Escherichia coli ; Klebsiella pneumoniae ; Proteus sp ;
35 Providentia sp ; Seratia marcescens ; Enterobacter cloacae ; Pseudomonas aeruginosa ; Salmonella (S. typhi et S. para-typhi).

Une étude plus détaillée réalisée avec 29 souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* montre une inhibition de 70 % dès la concentration de 0,06 mg/ml et de 80 % à 0,12 mg/ml.

05 L'activité antifongique a été testée vis-à-vis de contaminants micromycètes couramment rencontrés dans l'alimentation. Le test a été réalisé vis-à-vis de 25 espèces appartenant aux Adelomycètes (ex. *Altemaria tenuis* ; *Fusarium avenaceum* ; *Geotrichum candidum*...), aux Mucorales (ex. *Mucor mucedo*, *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus nigricans*...), aux Endomycetales (ex: *Candida lipolytica* ;
10 *Saccharomyces cerevisiae*...), aux Plectomycetes (ex: *Aspergillus clavatus*, *A. niger* ; *Penicillium chrysogenum*, *P. rubrum*...), aux Pyrenomycetes (ex: *Chaetomium globosum*, *Sordaria himicola*...).

15	Molécules testées	Souches à croissance inhibée ou diminuée (%)	Souches à croissance inhibée pour une CMI < 10 mg/ml (%)
	Acide rosmarinique	100	96
20	Oraoposide	92	64
	Acide caféique	83	52
	Acide chlorogénique	80	40
	Verbascoside	72	44

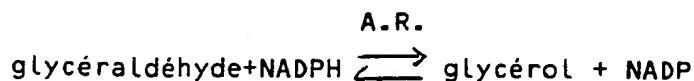
25

Exemple 5

Test d'inhibition de l'Aldose-réductase (EC1.1.1.21)(=A.R)

Mode opératoire

30 On évalue l'inhibition enzymatique in vitro à partir d'un extrait d'enzyme brut isolée de cristallins fraîchement obtenus à partir de bovins et de rats. Le principe de la réaction est le suivant :



35

Cette réaction se fait à pH = 6,2 à température ambiante et les mesures d'extinction à 340 nm. Les molécules testées sont dissoutes dans de l'eau bidistillée.

05 Les résultats obtenus par dosage du glycérol sont exprimés en CI 50 (Concentration permettant d'inhiber 50 % de l'activité enzymatique).

Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

10

A.R.-cristallin de veau

	Molécules testées	C.I.50 (Mole x L ⁻¹)
15	Oraposide (1)	$1,5 \times 10^{-7}$
	(2)	$1,65 \times 10^{-7}$
	Verbascoside (1)	$1,6 \times 10^{-6}$
	(2)	$1,6 \times 10^{-6}$
	Arenarioside (1)	$2,38 \times 10^{-6}$
	(2)	$1,47 \times 10^{-6}$

20

A.R.-Cristallin de rat

25	Oraposide	$2,20 \times 10^{-7}$
	Verbascoside	$1,78 \times 10^{-6}$
	Arenarioside	$4,18 \times 10^{-6}$

30 Activité inhibitrice de l'aldose réductase de divers esters hétérosidiques caféiques (1) et (2) correspondent à deux séries d'expériences différentes.

Conclusion

Les quatre molécules sont inhibitrices de l'aldose réductase aussi bien bovine que murine. La molécule la plus active est l'oraposide avec une CI 50 de $1,6 \times 10^{-7}$ mol/l. Elle semble plus active que l'une des molécules les plus prometteuses actuellement sur le marché, à savoir le Sorbinil^(R), qui est une molécule de synthèse de formule 6-fluorospirochromane-4,4'-imidazoline-2',5'-dione, dont la CI 50 est de 5×10^{-7} mol/l.

05

Exemple 6

Mise en évidence de l'activité anti-radicaux libres de l'oraposide sur des cultures de kératinocytes.

Introduction

10

L'activité anti-radicaux libres de l'oraposide a été étudiée sur une lignée de kératinocytes humains en culture, en comparaison avec des agents anti-radicaux libres bien connus.

L'activité protectrice de l'agent anti-radicaux libres a été évaluée par la mesure du malonaldéhyde (MDA) dans le milieu de culture (reflet de la lipoperoxydation des lipides de membrane cellulaire) après contact des cellules avec une source de radicaux libres oxygénés (selon la méthode de Placer Z.A. et vol. 1966 Anal. Biochem. 16 359-64, référence précédemment citée).

La cytotoxicité de ces substances est également mesurée par le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) à une concentration élevée (Z. Klin Chem. 1970 8 658 et Klin. Biochem. 1972 10 182).

A la lecture de l'ensemble de ces résultats, un classement des molécules est établi tenant compte à la fois de leur activité anti-radicaux libres et de leur potentiel cytotoxique au niveau cellulaire.

30

35

Matériels et méthodesMatériels :

- Cellules : kératinocytes humains issus d'un carcinome squameux.
- 05 - Milieu de culture : milieu de base DMEM (1/2), HAM F12 (1/2) (de la société GIBCO), additionnés de 5 % de sérum de veau foetal (de la société INTERMED).

Méthodes :

10

- La culture cellulaire et le traitement

Elle est réalisée dans des boîtes de pétri 60 mm (NUNC), densité d'ensemencement : 5 000 cellules par cm^2 .

15

Une semaine après l'ensemencement, la monocouche cellulaire à confluence est traitée par 500 μl d'une solution contenant un système générateur de radicaux oxygénés composé de Vitamine C 10^{-3} M, FeCl_3 10^{-4} M, FeSO_4 10^{-4} M dans du tampon PBS à pH 8 additionné de la molécule à tester (= milieu réactionnel).

20

Après une incubation de 2 h à 37°C , ce milieu d'incubation est récupéré pour le dosage de la MDA.

- Mesure de la LDH

25

Les composés sont testés à $200 \mu\text{M}$ dissout dans le DMSO, les cultures témoins contiennent une quantité identique de solvant.

Après 24 h puis pendant 6 j, on détermine la quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture après un traitement quotidien par les molécules anti-radicaux libres.

30

Le surnageant de culture est mis en présence de pyruvate de sodium et de NADH, la cinétique de l'activité LDH est mesurée au spectrophotomètre (Kit BOEHRINGER).

35

L'activité de la LDH est matérialisée par une augmentation de DO/mn (DO = densité optique) qui reflète donc la cytotoxicité de la molécule.

- Mesure du MDA

Après les 2 h d'incubation avec les cellules, les 500 μ l de milieu réactionnel sont prélevés et additionnés d'acide thio-
05 barbiturique pour doser le MDA à 532 nm.

Les résultats sont donnés en % d'inhibition de la produc-
tion de MDA.

- Les substances testées

10

- α tocophérol)
- BHT) substances de référence
- Orapoxide

15 Résultats et discussion

- Cytotoxicité

Elle a été testée à 200 μ M pour les 3 produits. Les
résultats seront donnés pour les 3 premiers jours de contact et
20 donnés en % d'augmentation de DO par rapport au témoin (+DMSO)

	J1	J2	J3
α Tocophérol	19 \pm 2	83 \pm 20	54 \pm 8
BHT	800 \pm 80	111 \pm 15	-
25 Orapoxide	0	0	0

(moyenne de 3 mesures)

Nous pouvons observer la forte cytotoxicité du BHT qui,
dès le premier jour, est responsable d'un fort relargage de LDH,
30 le phénomène est moins prononcé pour l' α -tocophérol, alors que
l'Orapoxide ne manifeste aucun effet cytotoxique vis-à-vis des
cellules.

- Dosage de la MDA

05 L'étude a été réalisée à la concentration $100\mu\text{M}$ pour les 3 produits après 2 h d'incubation avec le mélange réactionnel. Le MDA produit, suivi par spectrophotométrie donne des résultats exprimés en % d'inhibition de cette production par rapport au témoin (milieu réactionnel seul).

On évalue donc le pouvoir protecteur de la substance anti-radicalaire.

10

β Tocophérol	: 100 %
BHT	: 64 ± 2 %
Oraposide (1ère expérience)	: 70 ± 3 %
(2ème expérience)	: 60 ± 15 %
(moyenne des 3 mesures)	

15

Nous remarquons un pouvoir protecteur de l'Oraposide qui est voisin de celui du BHT, un peu moins puissant que l' β Tocophérol.

20

Conclusion

25 Le dosage du MDA dans le surnageant de la culture, nous a permis d'évaluer l'activité anti-radicaux libres de l'oraposide à $100\mu\text{M}$, il se révèle être aussi efficace que le BHT, toutefois, moins que l' β -tocophérol.

Mais il est à noter que contrairement à ces 2 molécules de référence, il ne présente aucun effet cytotoxique jusqu'à $200\mu\text{M}$.

30

On donne ci-après divers exemples de formulation cosmétique ou pharmaceutique avec l'Oraposide de ces dérivés selon l'invention.

35 Les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire.

Exemple 7Gel après soleil (anti-inflammatoire)

05	- extrait brut d'Orobanche (selon l'exemple 1)	20 %
	- gel de Carbopol 940 ^(R) glycérimé à 2,5 %	70 %
	- acide hyaluronique	0,1 %
	- conservateurs usuels	0,2 %
	- parfums	0,1 %
10	- H ₂ O q.s.p.	100 %

Exemple 8Crème anti-vieillessement

15	Oraposide encapsulé en liposomes (*)	25 %
	Huile de germe de blé	10 %
	Base auto-émulsionnable	5 %
	Eau, contenant conservateurs, parfums, antioxydants usuels, q.s.p.	100 %

20

(*) La composition des liposomes contenant l'oraposide est de :

	- lécithine de soja	3,6
	- β -sitostérol	0,4
	- oraposide	0,4
25	- peptide de soja	1,0
	- eau quantité suffisante pour 100 %.	

L'oraposide étant dans la phase aqueuse.

30

35

Exemple 9Sérum anti-tache

05	- extrait purifié d'Orobanche (selon l'exemple 1).....	5 %
	- éthanol	20 %
	- eau glycérinée	60 %
	- substances gélifiantes	0,6 %
	- parfums	0,1 %
10	- conservateurs	0,2 %
	- eau q.s.p.....	100 %

Exemple 10Protecteurs solaires

15	- extrait purifié d'Orobanche ...	10 %
	(selon l'exemple 1)	
	- titane micronisé	2 %
	- émulsionnants non ioniques	5 %
20	- huiles	30 %
	- gel neutralisé Carbopol 940 ^(R) à 2,5 %.....	0,2 %
	- silicone	5 %
25	- eau contenant conservateurs, antioxydants, parfums	
	q.s.p.	100 %.

Exemple 11Composition pharmaceutique

30 On prépare des gélules, destinées à une administration orale, dosées à 60 mg d'oraposide ou de ses dérivés de formule I précités, dans un excipient usuel pour gélule.

On pourra utiliser ces gélules, notamment pour le traitement de la maladie de Parkinson à une posologie de 4 à 6 gélules par jour, ce qui correspond en général à 1 à 6 mg d'oraposide pur par kg du poids du corps par jour.

35

L'invention couvre encore un procédé de préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisé en ce qu'il comprend l'incorporation d'une quantité efficace de l'oraposide ou de ses dérivés précités dans un excipient, support ou véhicule cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable. De préférence, on incorpore entre 0,001 % et environ 10 % en poids, encore mieux entre environ 0,1 et 5 % en poids, d'oraposide ou ses dérivés dans ladite composition, en particulier dans le cadre d'une application topique.

L'invention couvre encore un procédé de traitement d'affections provoquées par des radicaux libres quelle que soit leur origine, caractérisé en ce qu'il comprend l'administration au sujet souffrant de l'une desdites affections, sous une forme appropriée, d'une quantité efficace d'oraposide ou de ses dérivés de formule I précitée.

Selon une variante de réalisation de ce procédé de traitement, en particulier dans le cadre d'une application topique, on administre une composition dosée à 0,001 à 0 % en poids, de préférence de 0,01 à 5 % en poids, en oraposide ou en ses dérivés précités.

Selon une variante de réalisation particulière, on traite les inflammations, notamment les inflammations causées par une exposition excessive au soleil, aussi bien en application locale que par voie orale, rectale, ou par injection, d'une quantité efficace pour obtenir l'effet désiré d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

Selon une autre variante, on prévient ou on traite le vieillissement cellulaire, en particulier le vieillissement cutané et notamment actinique par application topique d'une quantité efficace pour obtenir l'effet désiré d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

Selon encore une autre variante, on réalise la protection de la peau contre le rayonnement ultraviolet UVA et UVB, par application topique d'une quantité efficace pour obtenir l'effet de protection ultraviolet désiré, d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

Selon encore une autre variante, on prévient ou on traite les taches pigmentaires cutanées par application topique d'une quantité efficace d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

05 Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise le traitement des intoxications hépatiques quelle que soit leur origine, par application de préférence par voie orale ou par injection, d'une quantité efficace pour obtenir l'effet désiré d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

10 Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise le traitement du diabète, notamment du diabète mellitus, ou des troubles du cristallin qui lui sont associés, en administrant au sujet souffrant de ladite affection, sous une forme appropriée, une quantité efficace d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de
15 formule I précités.

 Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise le traitement de la douleur en administrant au sujet souffrant de ladite douleur, sous une forme appropriée, une quantité efficace d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I
20 précités.

 Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise un traitement anti-allergique en administrant au sujet souffrant d'une allergie, sous une forme appropriée, une quantité efficace d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I
25 précités.

 Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise un traitement de la maladie de Parkinson, en administrant au sujet souffrant de ladite maladie, sous une forme appropriée, une quantité efficace d'oraposide et de ses dérivés de formule I
30 précités, de préférence en combinaison avec la L-DOPA.

 Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise un traitement anti-hypertenseur, en administrant au sujet souffrant d'hypertension artérielle, et sous une forme appropriée, une quantité efficace d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de
35 formule I précités.

Selon encore une autre variante de réalisation, on réalise un traitement anti-trémorique, en administrant au sujet souffrant de tremblements, en particulier de tremblements dus à la maladie de Parkinson, et sous une forme appropriée, une quantité
05 efficace d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

Selon encore une autre variante de réalisation, on administre à un sujet, sous une forme appropriée, une quantité
10 efficace pour l'obtention d'un effet psychotrope, d'oraposide ou de l'un de ses dérivés de formule I précités.

15

20

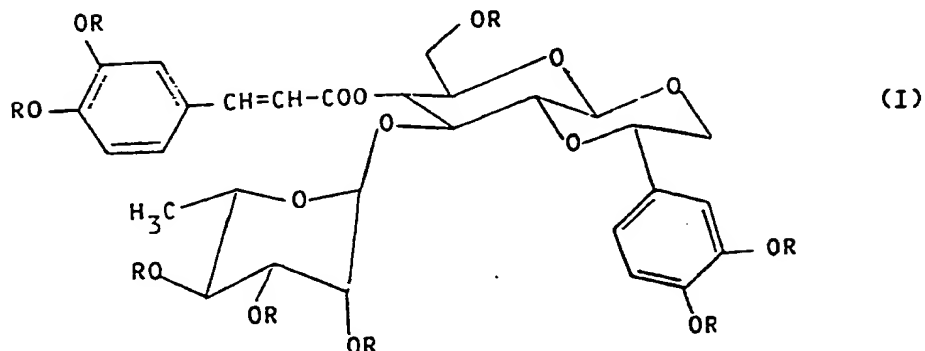
25

30

35

REVENDICATIONS

1. Nouveau dérivé de l'acide caféique, caractérisé en ce qu'il s'agit de l'oraposide ou de ses dérivés de formule I suivante :



15 dans laquelle un ou plusieurs R représentent indépendamment un atome d'hydrogène, un groupe alkyle inférieur en C_1-C_5 , en particulier méthyle, ou un groupe acyle, en particulier en C_1-C_6 , notamment acétyle.

20 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que seuls les groupes OR portés par les cycles glucopyranosyle ou rhamnopyranosyle sont acylés, notamment acétylés.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que seuls les groupes OR portés par les cycles phényle sont alkylés, notamment méthylés.

25 4. Composé selon la revendication 1 à 3, caractérisé en ce que l'oraposyle ou des dérivés sont extraits à partir d'une plante de la famille des Orobanchacées, en particulier *Orobancha rapum genistae*.

30 5. Composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre d'ingrédient actif l'oraposide ou ses dérivés de formule I tels que définis à l'une des revendications 1 à 4.

35 6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend d'environ 0,001 à environ 10 % en poids, de préférence environ 0,1 à environ 5 % en poids, de l'oraposide ou de

ses dérivés précités, par rapport au poids total de la composition finale.

7. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité antiradicaux libres.

05 8. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité anti-inflammatoire.

9. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité hépatoprotectrice.

10 10. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité antivieillessement cellulaire, en particulier antivieillessement des cellules de la peau et notamment antivieillessement actinique.

15 11. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité de prévention ou de traitement des taches pigmentaires cutanées.

12. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité inhibitrice d'aldose réductase.

20 13. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité inhibitrice de 5-Lipoxygénase.

14. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité inhibitrice de dopa-décarboxylase.

25 15. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité β -bloquante.

16. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité de filtration du rayonnement ultraviolet UVA et UVB.

30 17. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité analgésique.

18. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité anti-allergique.

35 19. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle présente une activité anti-trémorique.

20. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'elle présente une activité psychotrope.

21. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'elle présente un effet anti-hypertenseur.

05

22. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle n'est pas additionnée d'agent conservateur antibactérien ou antifongique et/ou d'agent conservateur antioxydant, en raison de l'activité antibactérienne ou antioxydante de l'oraposide ou ses dérivés.

10

15

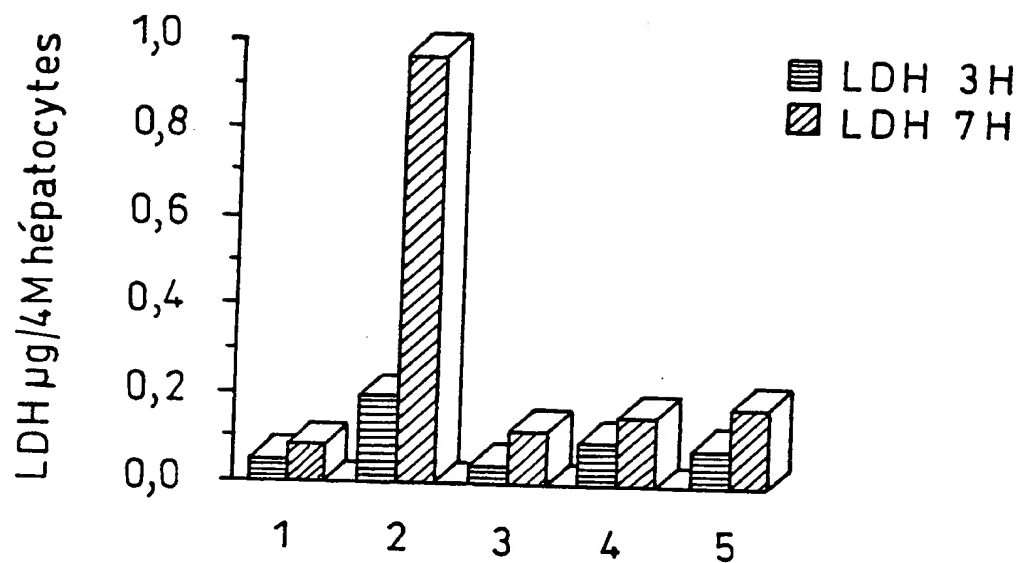
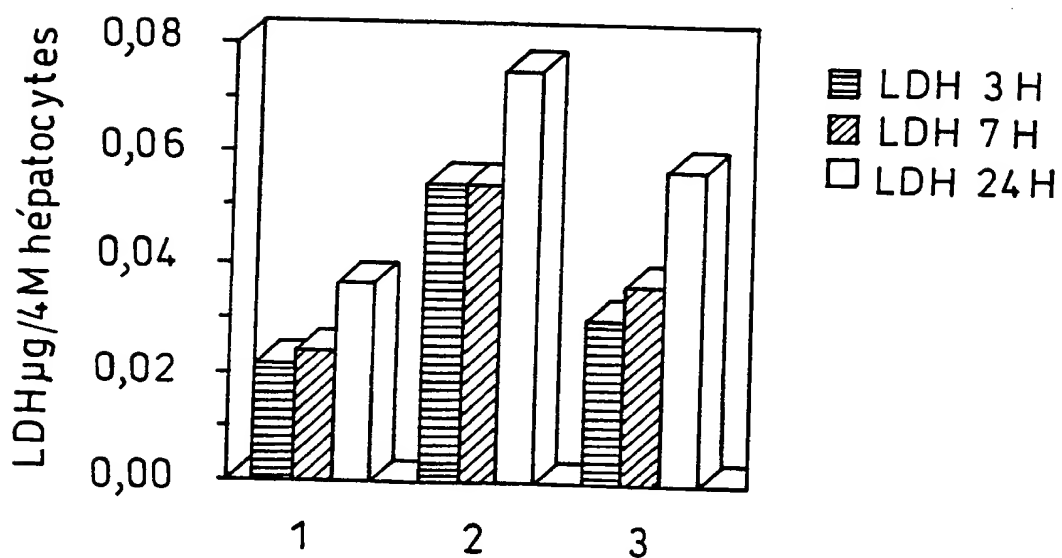
20

25

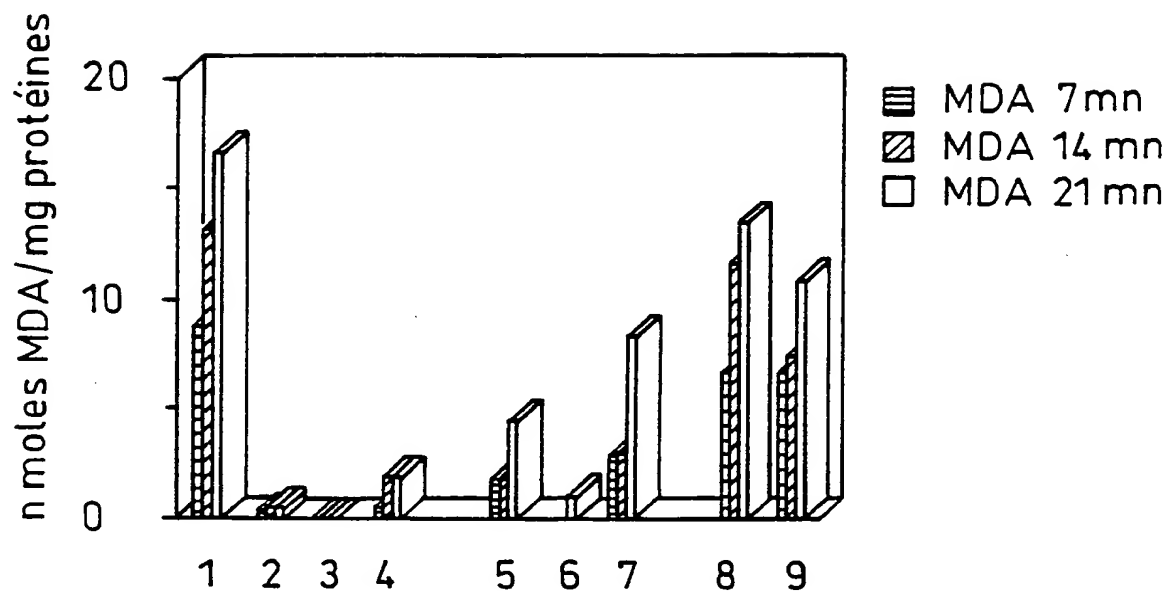
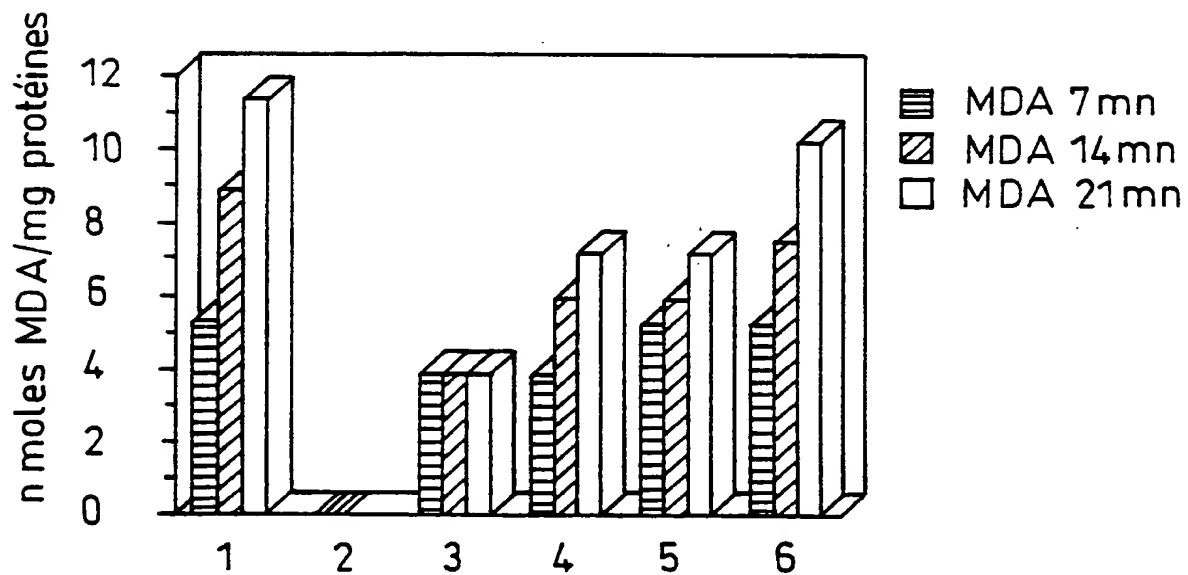
30

35

1 / 2

*fig_1**fig_2*

2/2

*fig-3**fig-4*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00229

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. 5 C 07 H 15/18 A 61 K 7/48 A 61 K 31/70		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. 5	C 07 H 15/00 A 61 K 7/00 A 61 K 31/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	FR,A,2302745 (S.C.R.E.E.N.) 1 October 1976 see the whole document	1-22
Y	FR,A,2314725 (S.C.R.E.E.N.) 14 January 1977 see the whole document	1-22
Y	Chemical Abstracts, Vol. 106, No. 19, 11 May 1987 (Columbus, Ohio, US) see page 574, abstract 155103s, & JP,A, 61291525 (OSAKA YAKUHIN KENKYUSHO K.K.) 22 December 1986	1-22
Y	Chemical Abstracts, Vol. 107, No. 6, 10 August 1987, (Columbus, Ohio, US) S. Kitagawa et al.: "Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae fructus. VIII. On isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of forsythia koreana and their antibacterial activity", see page 407, abstract 46141c, & Yakugaku Zasshi 1987, 107(4), 274-8	1-22
Y	Chemical Abstracts, Vol. 107, No. 7, 17 August 1987 (Columbus, Ohio, US) Y. Limura et al.: "Effects of caffeoylglycosides on arachidonate ./...	1-22
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
11 November 1991 (11.11.91)	17 January 1992 (17.01.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	metabolism in leukocytes", see page 37, abstract 51592e, & Planta Med. 1987, 53(2), 148-53 ---	
Y	Chemical Abstracts, Vol. 114, No. 10, 11 March 1991, see page 423, abstract 88423w, & JP, A, 2255607 (PIAS CO., LTD) 16 October 1990 ---	1,5,10,11
E	FR,A,2652086 (ANDARY) 22 March 1991, see the whole document -----	1-22

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100229
SA 46267

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 14/01/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2302745	01-10-76	DE-A,B,C 2609533	16-09-76
FR-A- 2314725	14-01-77	None	
FR-A- 2652086	22-03-91	None	

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00229

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

Int.C1.5 C 07 H 15/18 A 61 K 7/48 A 61 K 31/70

II. D. MAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	C 07 H 15/00 A 61 K 7/00 A 61 K 31/00

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	FR,A,2302745 (S.C.R.E.E.N.) 1er octobre 1976, voir le document en entier ---	1-22
Y	FR,A,2314725 (S.C.R.E.E.N.) 14 janvier 1977, voir le document en entier ---	1-22
Y	Chemical Abstracts, volume 106, no. 19, 11 mai 1987 (Columbus, Ohio, US) voir page 574, abrégé 155103s, & JP, A, 61291525 (OSAKA YAKUHI KENKYUSHO K.K.) 22 décembre 1986 --- -/-	1-22

⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹

"A" document définissant l'état général de la technique, non
considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt interna-
tional ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de
priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une
autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à
une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais
postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt
international ou à la date de priorité et n'appartenant pas
à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre
le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention reven-
diquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme
impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention reven-
diquée ne peut être considérée comme impliquant une
activité inventive lorsque le document est associé à un ou
plusieurs autres documents de même nature, cette combi-
naison étant évidente pour une personne du métier.

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11-11-1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17. 11. 92

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

Dagmar Frank

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	Chemical Abstracts, volume 107, no. 6, 10 août 1987, (Columbus, Ohio, US) S. Kitagawa et al.: "Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae fructus. VIII. On isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of forsythia koreana and their antibacterial activity", voir page 407, abrégé 46141c, & Yakugaku Zasshi 1987, 107(4), 274-8 ---	1-22
Y	Chemical Abstracts, volume 107, no. 7, 17 août 1987 (Columbus, Ohio, US) Y. Limura et al.: "Effects of caffeoylglycosides on arachidonate metabolism in leukocytes", voir page 37, abrégé 51592e, & Planta Med. 1987, 53(2), 148-53 ---	1-22
Y	Chemical Abstracts, volume 114, no. 10, 11 mars 1991, voir page 423, abrégé 88423w, & JP, A, 2255607 (PIAS CO., LTD) 16 octobre 1990 ---	1,5,10, 11
E	FR,A,2652086 (ANDARY) 22 mars 1991, voir le document en entier -----	1-22

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100229
SA 46267

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 14/01/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2302745	01-10-76	DE-A, B, C 2609533	16-09-76
FR-A- 2314725	14-01-77	Aucun	
FR-A- 2652086	22-03-91	Aucun	

EPO FORM P072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82